

【化1】

[illegible]

【請求項6】内水相における生理活性ペプチドの濃度が約0.1ないし約150% (W/V) である請求項1記載の製造法。

【請求項7】油相における生体内分解性ポリマーの濃度が約0.1ないし約80%（W/W）である請求項1記載の製造法。

【請求項8】油相に対する内水相の量比が約1ないし約50%（V/V）である請求項1記載の製造法。

【請求項9】外水相の体積が油相体積の約1ないし約10,000倍である請求項1記載の製造法。

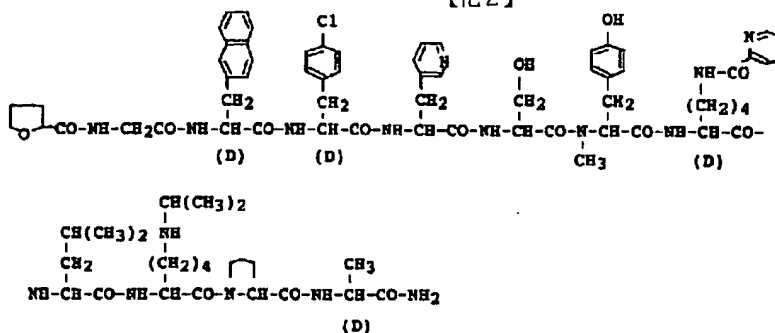
【請求項10】徐放性製剤がマイクロカプセルである請求項1記載の製造法。

【請求項11】 Xが2-テトラヒドロフリルカルボキサミドである請求項1記載の製造法。

【請求項12】 2-テトラヒドロフリルカルボキサミドが(2S)-2-テトラヒドロフリルカルボキサミドである請求項1記載の製造法。

【請求項 13】 生理活性ペプチドが

【化2】



である請求項 1 記載の製造法。

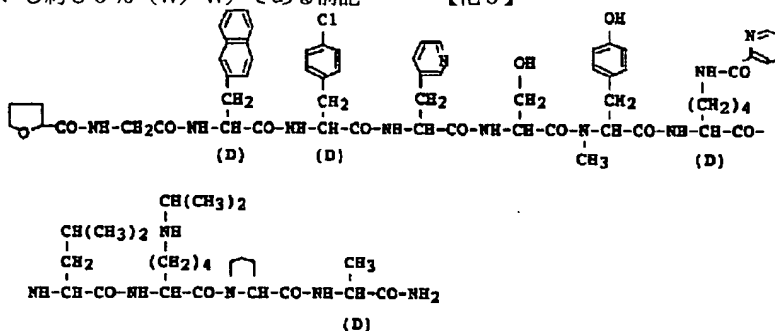
【化3】

【請求項 14】 生理活性ペプチドが

る前記(1)記載の製造法、(3)脂肪族ポリエステルが乳酸-グリコール酸共重合体である前記(2)記載の製造法、(4)乳酸-グリコール酸共重合体の乳酸及びグリコール酸の組成比(モル%)が約100/0ないし約40/60である前記(3)記載の製造法、(5)乳酸-グリコール酸共重合体の重量平均分子量が約5,000ないし約20,000である前記(3)記載の製造法、(6)内水相における生理活性ペプチドの濃度が約0.1ないし約150%(W/V)である前記(1)記載の製造法。(7)油相における生体内分解性ポリマーの濃度が約0.1ないし約80%(W/W)である前記

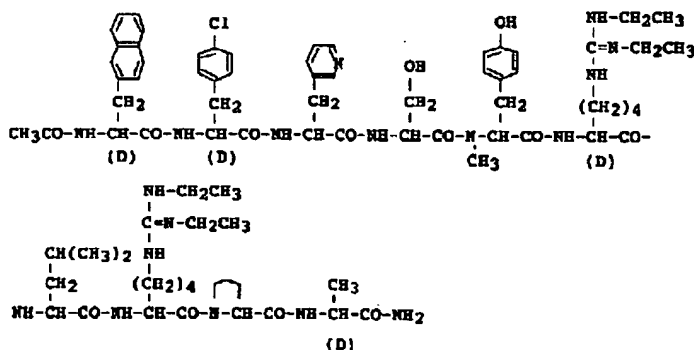
(1)記載の製造法、(8)油相に対する内水相の量比が約1ないし約50%(V/V)である前記(1)記載の製造法、(9)外水相の体積が油相体積の約1ないし約10,000倍である前記(1)記載の製造法、(10)徐放性製剤がマイクロカプセルである前記(1)記載の製造法、(11)Xが2-テトラヒドロフリルカルボキサミドである前記(1)記載の製造法、(12)2-テトラヒドロフリルカルボキサミドが(2S)-2-テトラヒドロフリルカルボキサミドである前記(11)記載の製造法、(13)生理活性ペプチドが

【化5】



である前記(1)記載の製造法、(14)生理活性ペプチドが

【化6】



である前記(1)記載の製造法、(15)前記(1)記載の製造法により製造される徐放性製剤、(16)生理活性ペプチドの含有量が生体内分解性ポリマーに対して約0.01ないし約50%(W/W)である前記(15)記載の徐放性製剤、(17)マイクロカプセルである前記(15)記載の徐放性製剤、および(18)マイクロカプセルが注射用である前記(17)記載の徐放性製剤に関する。

【0005】本明細書中で使用される略号は次のような意味を示す。

NacD2Nal : N-アセチル-D-3-(2-ナフチル)アラニル

D4C1Phe : D-3-(4-クロロフェニル)アラニル

D3Pal : D-3-(3-ピリジル)アラニル

NMeTyr : N-メチルチロシル

DLys(Nic) : D-(イプシロン-N-ニコチノイル)リシル

Lys(Nisp) : (イプシロン-N-イソプロピル)リシル

DhArg(Et2) : D-(N,N'-ジエチル)ホモアルギニル

その他のアミノ酸に関し、略号で表示する場合、IUPAC-IUB コミッション・オブ・バイオケミカル・ノーメンクレチャー (Commission on Biochemical Nomenclature) (ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (European Journal of Biochemistry) 第138巻、9~37頁、1984年) による略号あるいは該当分野における慣用略号に基づくものとし、また、光学異性体がありうる場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

【0006】本発明において、式[1]で表される生理活性ペプチド(以下、ペプチド[1]と略することもある)またはその塩は、LH-RH拮抗作用を有し、前立腺癌、前立腺肥大症、子宮内膜症、子宮筋腫、子宮線維腫、思春期早発症、乳癌、膀胱癌、子宮頸部癌、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、大腸癌、胃炎、ホジ

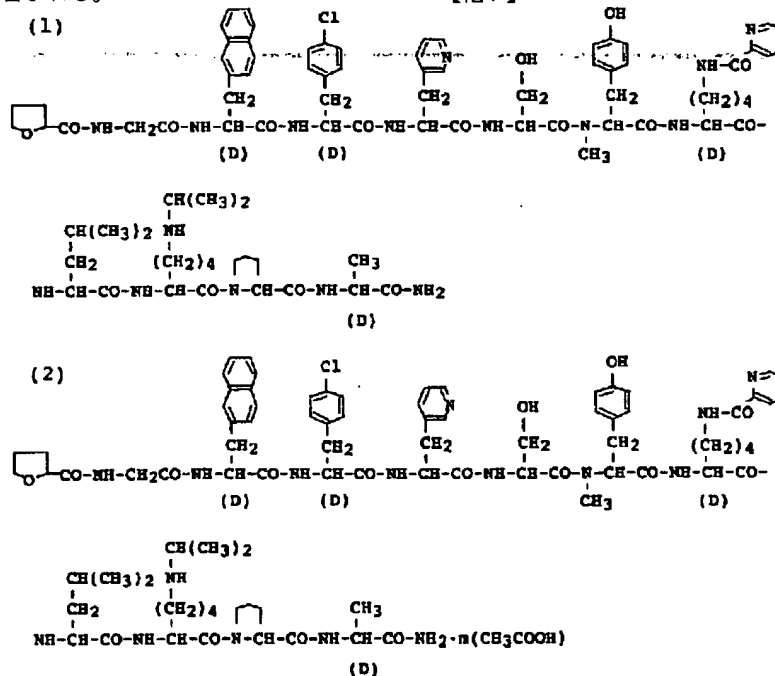
キン病、悪性黒色腫、転移、多発性骨髄腫、非ホジキン性リンパ腫、非小細胞肺癌、卵巣癌、消化性潰瘍、全身性真菌感染症、小細胞肺癌、心弁膜症、乳腺症、多嚢胞性卵巣、不妊、慢性無排卵症婦人における適性排卵誘発、ざそう（アクネ）、無月経（例、続発性無月経）、卵巣および乳房の嚢胞性疾患（多嚢胞性卵巣を含む）、婦人科系の癌、卵巣性高アンドロゲン血症および多毛症、胸腺幼若化を介したT細胞産生によるAIDS、男性性犯罪者の治療のための男性避妊等のホルモン依存性疾患の治療および避妊、月経前症候群（PMS）の症状軽減、体外受精（IVF）等に有効である。

【0007】式〔1〕において、Xは好ましくは2-テトラヒドロフリルカルボキサミドである。Xは、さらに好ましくは（2S）-テトラヒドロフリルカルボキサミドである。また、Aは好ましくはニコチノイルである。Bは好ましくはイソプロピルである。ペプチド〔1〕が1種以上の不斉炭素原子を有する場合、2種以上の光学異性体が存在する。このような光学異性体およびこれらの混合物も本発明に含まれる。

【0008】ペプチド〔1〕またはその塩は、自体公知の方法により製造できる。このような方法としては、例えば特開平3-101695、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー（Journal of Medicinal Chemistry）、35巻、3942頁、（1992）などに記載の方法あるいはこれに類する方法が挙げられる。ペプチド〔1〕の塩としては、好ましくは、薬理的に許容される塩が用いられる。このような塩としては、無機酸（例、塩酸、硫酸、硝酸など）、有機酸（例、炭酸、重炭酸、コハク酸、酢酸、プロピオン酸、トリフルオロ酢酸など）などの塩が挙げられる。ペプチド〔1〕の塩は、さらに好ましくは有機酸（例、炭酸、重炭酸、コハク酸、酢酸、プロピオン酸、トリフルオロ酢酸など）との塩である。ペプチド〔1〕の塩は、特に好ましくは酢酸との塩である。これらの塩は、モノないしトリ塩のいずれであってもよい。好ましくは、ジないしトリ塩である。

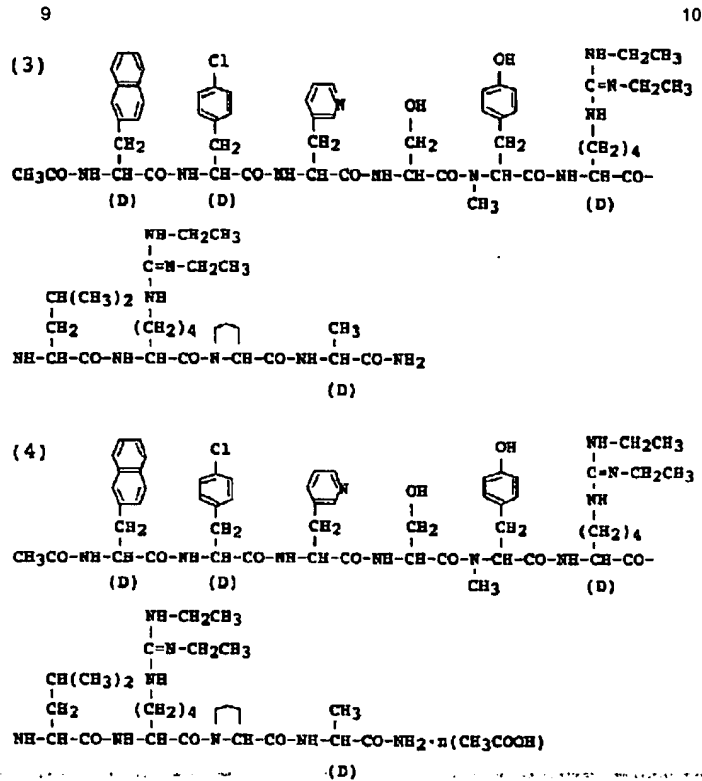
【0009】ペプチド〔1〕またはその塩の好ましい例を以下に示す。

【化7】



〔式中、mは1ないし3の実数を示す〕

40 【化8】



〔式中、nは1ないし3の実数を示す〕

ペプチド〔1〕またはその塩は特に好ましくは上記
(1)、(2)である。

【0010】末端に遊離のカルボキシル基を有する生体内分解性ポリマーは、GPC測定による数平均分子量と末端基定量による数平均分子量とがほぼ一致する生体内分解性ポリマーである。末端基定量による数平均分子量は以下のように算出される。約1ないし3gの生体内分解性ポリマーを、アセトン(25ml)とメタノール(5ml)の混合溶媒に溶解し、フェノールフタレインを指示薬としてこの溶液中のカルボキシル基を室温(20℃)での攪拌下0.05Nアルコール性水酸化カリウム溶液で速やかに滴定し、次式より数平均分子量を算出する。
末端基定量による数平均分子量 = $20000 \times A/B$
A: 生体内分解性ポリマーの質量(g)
B: 滴定終点までに添加した0.05Nアルコール性水酸化カリウム溶液の量(ml)

例えば、1種類以上の α -ヒドロキシ酸類から無触媒脱水重縮合法で合成され、末端に遊離のカルボキシル基を有する重合体では、GPC測定による数平均分子量と末端定量による数平均分子量とがほぼ一致する。これに対し、環状二量体から触媒を用いて開環重縮合法で合成され、末端に遊離のカルボキシル基を実質的には有しない重合体では、末端基定量による数平均分子量がGPC測定による数平均分子量を大きく上回る。この相違によって、末端に遊離のカルボキシル基を有する重合体は、末端に遊離のカルボキシル基を有しない重合体と明確に区別することができる。

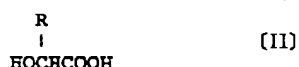
【0011】末端基定量による数平均分子量が絶対値であるのに対して、GPC測定による数平均分子量は、各種分析・解析条件(例えば移動相の種類、カラムの種類、基準物質、スライス幅の選択、ベースラインの選択等)によって変動する相対値である。そのため、両者の一義的な数値による関連づけは困難であるが、例えばGPC測定による数平均分子量と末端基定量による数平均分子量とがほぼ一致するとは、末端基定量による数平均分子量がGPC測定による数平均分子量の約0.4倍から約2倍、好ましくは約0.5倍から約2倍、さらに好ましくは約0.8倍から約1.5倍の範囲であることをいう。また、末端基定量による数平均分子量がGPC測定による数平均分子量を大きく上回るとは、末端基定量による数平均分子量がGPC測定による数平均分子量の約2倍を越えることをいう。

【0012】末端に遊離のカルボキシル基を有する生体内分解性ポリマーの具体例としては、例えば α -ヒドロキシカルボン酸類(例、グリコール酸、乳酸、ヒドロキシ酪酸等)、ヒドロキシジカルボン酸類(例、リンゴ酸等)、ヒドロキシトリカルボン酸(例、クエン酸等)等の1種以上から無触媒脱水重縮合で合成された重合体、共重合体、あるいはこれらの混合物、ポリ α -シアノアクリル酸エステル、ポリアミノ酸(例、ポリ γ -ベンジル-L-グルタミン酸等)、無水マレイン酸系共重合体(例、スチレン-マレイン酸共重合体等)等が挙げられる。生体内分解性ポリマーは、好ましくは脂肪族ポリエステル、例えば α -ヒドロキシカルボン酸類(例、グリコール酸、乳酸、ヒドロキシ酪酸等)、ヒドロキシ

ジカルボン酸類（例、リンゴ酸等）、ヒドロキシトリカルボン酸（例、クエン酸等）等の1種以上から無触媒脱水重縮合で合成された重合体、共重合体、あるいはこれらの混合物等が挙げられる。重合の形式は、ランダム、ブロック、グラフトのいずれでもよい。また、上記した α -ヒドロキシ酸類、ヒドロキシジカルボン酸類、ヒドロキシトリカルボン酸類が分子内に光学活性中心を有する場合、D-、L-、D-L-体のいずれも用いることができる。

【0013】末端に遊離のカルボキシル基を有する生体内分解性ポリマーは、好ましくは（1）乳酸-グリコール酸共重合体または（2）（A）グリコール酸と式

【化9】



（式中、Rは炭素数2から8のアルキル基を表す）で示されるヒドロキシカルボン酸との共重合体および（B）ポリ乳酸を混合した生体内分解性ポリマーである。末端に遊離のカルボキシル基を有する生体内分解性ポリマーは、特に好ましくは乳酸-グリコール酸共重合体である。

【0014】生体内分解性ポリマーとして乳酸-グリコール酸共重合体を用いる場合、その組成比（乳酸/グリコール酸）（モル%）は約100/0ないし約40/60が好ましい。組成比は、さらに好ましくは約90/10ないし約50/50である。上記乳酸-グリコール酸共重合体の重量平均分子量は、好ましくは約5,000から約25,000である。重量平均分子量は、さらに好ましくは約7,000から約20,000、特に好ましくは約8,000から約15,000である。また、乳酸-グリコール酸共重合体の分散度（重量平均分子量/数平均分子量）は、好ましくは約1.2から約4.0である。分散度は、さらに好ましくは、約1.5から約3.5である。上記乳酸-グリコール酸共重合体は、公知の製造法、例えば特開昭61-28521に記載の製造法に従って製造できる。

【0015】乳酸-グリコール酸共重合体の分解・消失速度は組成あるいは分子量によって大きく変化するが、一般的にはグリコール酸分率が低いほど分解・消失が遅いため、グリコール酸分率を低くするかあるいは分子量を大きくすることによって放出期間を長くすることができる。逆に、グリコール酸分率を高くするかあるいは分子量を小さくすることによって放出期間を短くすることもできる。長期間（例えば1ないし4カ月）型徐放性製剤とするには、上記の組成比および重量平均分子量の範囲の乳酸-グリコール酸共重合体が好ましい。上記の組成比および重量平均分子量の範囲の乳酸-グリコール酸共重合体よりも分解が速い乳酸-グリコール酸共重合体を選択すると初期バーストの抑制が困難であり、逆に上

記の組成比および重量平均分子量の範囲の乳酸-グリコール酸共重合体よりも分解が遅い乳酸-グリコール酸共重合体を選択すると有効量の薬物が放出されない期間を生じやすい。

【0016】上記した式【II】中、Rで示される炭素数2から8の直鎖もしくは分枝状のアルキル基としては、例えばエチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、tert-ペンチル、1-エチルプロピル、ヘキシル、イソヘキシル、1,1-ジメチルブチル、2,2-ジメチルブチル、3,3-ジメチルブチル、2-エチルブチルなどが挙げられる。好ましくは、炭素数2から5の直鎖もしくは分枝状のアルキル基が用いられる。具体例としては、例えばエチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチルなどが挙げられる。特に好ましくは、Rはエチルである。

【0017】式【II】で示されるヒドロキシカルボン酸としては、例えば2-ヒドロキシ酪酸、2-ヒドロキシ吉草酸、2-ヒドロキシ-3-メチル酪酸、2-ヒドロキシカプロン酸、2-ヒドロキシイソカプロン酸、2-ヒドロキシカプリン酸などが挙げられる。このうち特に、2-ヒドロキシ酪酸、2-ヒドロキシ吉草酸、2-ヒドロキシ-3-メチル酪酸、2-ヒドロキシカプロン酸が好ましい。式【II】で示されるヒドロキシカルボン酸は、特に好ましくは2-ヒドロキシ酪酸である。これらのヒドロキシカルボン酸はD-体、L-体およびD、L-体の何れでもよいが、D-体/L-体（モル%）が約75/25ないし約25/75の範囲のものが好ましい。さらに好ましくは、D-体/L-体（モル%）が約60/40ないし約40/60の範囲のヒドロキシカルボン酸である。特に好ましくは、D-体/L-体（モル%）が約55/45ないし約45/55の範囲のヒドロキシカルボン酸である。

【0018】グリコール酸と式【II】で示されるヒドロキシカルボン酸との共重合体（以下、グリコール酸共重合体（A）と略称する）において、共重合の形式は、ランダム、ブロック、グラフトの何れでもよい。好ましくは、ランダム共重合体である。式【II】で示されるヒドロキシカルボン酸は、1種または2種以上適宜の割合で用いてもよい。グリコール酸共重合体（A）におけるグリコール酸と式【II】で示されるヒドロキシカルボン酸との組成比は、グリコール酸が約10ないし約75モル%、残りがヒドロキシカルボン酸である場合が好ましい。さらに好ましくは、グリコール酸が約20ないし約75モル%、残りがヒドロキシカルボン酸である場合である。特に好ましくは、グリコール酸が約40ないし約70モル%、残りがヒドロキシカルボン酸である場合である。これらグリコール酸共重合体は、重量平均分子量が約2,000から約50,000のものが用いられる。重量平均分子量は、好ましくは約3,000から約40,000である。重量平均分子量は、さらに好まし

くは約8,000から約30,000である。また、これらのグリコール酸共重合体の分散度(重量平均分子量/数平均分子量)は、好ましくは約1.2から約4.0である。分散度は、特に好ましくは約1.5から約3.5である。上記グリコール酸共重合体(A)は、公知の製造法、例えば特開昭61-28521に記載の方法に従って製造できる。

【0019】ポリ乳酸としては、L-体、D-体およびこれらの混合物の何れでもよいが、D-体/L-体(モル%)が約75/25ないし約20/80の範囲のものが好ましい。さらに好ましくは、D-体/L-体(モル%)が約60/40ないし約25/75の範囲のポリ乳酸である。特に好ましくは、D-体/L-体(モル%)が約55/45ないし約25/75の範囲のポリ乳酸である。該ポリ乳酸の重量平均分子量は、好ましくは約1,500から約30,000である。重量平均分子量は、さらに好ましくは約2,000から約20,000である。重量平均分子量は、特に好ましくは約3,000から約15,000である。また、ポリ乳酸の分散度は、好ましくは約1.2から約4.0である。分散度は、特に好ましくは約1.5から約3.5である。ポリ乳酸の製造法については、乳酸の二量体であるラクチドを開環重合する方法と乳酸を脱水重縮合する方法が知られている。本発明で使用する比較的低分子量のポリ乳酸を得るためには、乳酸を直接脱水重縮合する方法が好ましい。該製造法は、例えば特開昭61-28521に記載されている。

【0020】グリコール酸共重合体(A)とポリ乳酸(B)は、例えば(A)/(B)で表わされる混合比(重量%)が約10/90ないし約90/10の範囲で使用される。混合比(重量%)は、好ましくは約20/80ないし約80/20である。混合比(重量%)は、さらに好ましくは約30/70ないし約70/30である。(A)、(B)のうち何れかの成分が多すぎると(A)もしくは(B)成分を単独で使した場合とほとんど同じ薬物放出パターンを有する製剤しか得られず、混合基剤による放出後期の直線的な放出パターンが期待できない。グリコール酸共重合体(A)およびポリ乳酸の分解・消失速度は分子量あるいは組成によって大きく変化するが、一般的にはグリコール酸共重合体(A)の分解・消失速度の方が速いため、混合するポリ乳酸の分子量を大きくする、あるいは(A)/(B)で表わされる混合比を小さくすることによって放出期間を長くすることができる。逆に、混合するポリ乳酸の分子量を小さくする、あるいは(A)/(B)で表わされる混合比を大きくすることによって放出期間を短くすることもできる。さらに、式[II]で示されるヒドロキシカルボン酸の種類や割合を変化させることにより、放出期間を調節することもできる。

【0021】本明細書での重量平均分子量および分散度

とは、重量平均分子量が120,000、52,000、22,000、9,200、5,050、2,950、1,050、580、162の9種類のポリスチレンを基準物質としてゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)で測定したポリスチレン換算の分子量および算出した分散度をいう。測定は、GPCカラムKF804Lx2(昭和電工製)、RIモニターL-3300(日立製作所製)を使用、移動相としてクロロホルムを用いた。

【0022】以下に、本発明の製造法について詳述する。まず、ペプチド[I]またはその塩(以下、薬物と略することもある)を水に溶解または分散し、これに必要であればゼラチン、寒天、ポリビニールアルコールあるいは塩基性アミノ酸(例えばアルギニン、ヒスチジン、リジン)などの薬物保持物質を加えて溶解もしくは懸濁し、内水相とする。内水相における薬物の濃度は、好ましくは約0.1ないし約150%(W/V)である。さらに好ましくは約20ないし約130%(W/V)である。特に好ましくは約60ないし約120%(W/V)である。内水相には、薬物の安定性、溶解性を保つためのpH調整剤として、炭酸、酢酸、ジユウ酸、クエン酸、リン酸、塩酸等、水酸化ナトリウム、アルギニン、リジンおよびそれらの塩などを添加してもよい。また、さらに薬物の安定化剤として、アルブミン、ゼラチン、クエン酸、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム、デキストリン、亜硫酸水素ナトリウム、ポリエチレングリコール等のポリオール化合物などを、あるいは保存剤として、一般に用いられるパラオキシ安息香酸エステル類(メチルパラベン、プロピルパラベンなど)、ベンジルアルコール、クロロブタノール、チメロサルなどを添加してもよい。

【0023】このようにして得られた内水相を、末端に遊離のカルボキシル基を有する生体内分解性ポリマー(以下、ポリマーと略することもある)を含む溶液(油相)中に加え、ついで乳化操作を行い、W/O型乳化物を製造する。該乳化操作は、公知の分散法、例えば断続振とう法、プロペラ型攪拌機あるいはタービン型攪拌機などのミキサーによる方法、コロイドミル法、ホモジナイザー法、超音波照射法等により行われる。上記したポリマーを含む溶液(油相)は、該ポリマーを水と実質的に混和しない有機溶媒に溶解したものが用いられる。該有機溶媒の水に対する溶解度は、好ましくは、常温(20℃)で3%(W/W)以下である。また有機溶媒の沸点は120℃以下であることが好ましい。有機溶媒としては、例えばハロゲン化炭化水素(例、ジクロロメタン、クロロホルム、クロロエタン、トリクロロエタン、四塩化炭素など)、炭素数3以上のアルキルエーテル類(例、イソプロピルエーテルなど)、脂肪酸のアルキル(炭素数4以上)エステル(例、酢酸ブチルなど)、芳香族炭化水素(例、ベンゼン、トルエン、キシレンな

ど)等が挙げられる。これらは2種以上適宜の割合で混合して用いてもよい。有機溶媒は、さらに好ましくはハロゲン化炭化水素(例、ジクロロメタン、クロロホルム、クロロエタン、トリクロロエタン、四塩化炭素など)である。有機溶媒は、特に好ましくはジクロロメタンである。油相におけるポリマーの濃度は、該ポリマーの分子量、溶媒の種類によって異なるが、好ましくは約0.01ないし約80%(W/W)である。さらに好ましくは約0.1ないし約70%(W/W)である。特に好ましくは約1ないし約60%(W/W)である。徐放性製剤において、薬物の配合量は、薬物の種類、所望の薬理効果および効果の持続期間などによって異なるが、基剤の生体内分解性ポリマーに対して約0.01から約50%(w/w)用いられる。好ましくは、約0.1から約40%(w/w)用いられる。特に好ましくは、約1から約30%(w/w)用いられる。

【0024】ついで、このようにして製造されたW/O型乳化物を水中乾燥法に付す。該水中乾燥法は、W/O型乳化物を水相(外水相)に加え、W/O/W型乳化物を形成させた後、油相中の溶媒を除去することにより行われる。外水相の体積は、一般的には油相体積の約1ないし約10,000倍から選ばれる。さらに好ましくは、約2ないし約5,000倍から選ばれる。特に好ましくは、約5ないし約2,000倍から選ばれる。上記外水相中に乳化剤を加えてもよい。該乳化剤は、一般に安定なW/O/W型乳化物を形成できるものであればいずれでもよい。具体的には、例えばアニオン性界面活性剤(オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウムなど)、非イオン性界面活性剤(ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル〔ツイーン(Tween)80、ツイーン(Tween)60、アトラスパウダー社〕、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体〔HC0-60、HC0-50、日光ケミカルズ〕など)、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース、レシチン、ゼラチン、ヒアルロン酸などが挙げられる。乳化剤は、好ましくはポリビニルアルコールである。これら乳化剤の中の1種類か、いくつかを組み合わせ使用してもよい。使用の際の濃度は、約0.001から約20%(W/W)の範囲から適宜選択できる。さらに好ましくは約0.01から約10%(W/W)の範囲で用いられる。特に好ましくは約0.05から約5%(W/W)の範囲で用いられる。

【0025】上記外水相中に浸透圧調節剤を加えてもよい。本発明で用いられる浸透圧調節剤としては、水溶液とした場合浸透圧を示すものであればいかなる物質であってもよい。該浸透圧調節剤の具体例としては、例えば水溶性の多価アルコール類、水溶性の一価アルコール類、水溶性の単糖類、二糖類およびオリゴ糖あるいはそれらの誘導体、水溶性のアミノ酸、水溶性のペプチド、タンパク質あるいはそれらの誘導体などが挙げられる。

【0026】上記水溶性の多価アルコール類としては、例えばグリセリン等の二価アルコール類、アラビトール、キシリトール、アドニトール等の五価アルコール類、マンニトール、ソルビトール、ズルシトール等の六価アルコール類などが挙げられる。これらのうち六価のアルコール類が好ましい。なかでも、マンニトールが特に好ましい。上記水溶性の一価アルコール類としては、例えばメタノール、エタノール、イソプロピルアルコール等が挙げられる。これらのうちエタノールが好ましい。上記水溶性の単糖類としては、例えばアラビノース、キシロース、リボース、2-デオキシリボース等の五炭糖類、ブドウ糖、果糖、ガラクトース、マンノース、ソルボース、ラムノース、フコース等の六炭糖類が挙げられる。これらのうち六炭糖類が好ましい。上記水溶性の二糖類としては、例えば麦芽糖、セロビオース、 α 、 α -トレハロース、乳糖、ショ糖などが挙げられる。これらのうち乳糖、ショ糖が好ましい。上記水溶性のオリゴ糖としては、例えばマルトトリオース、ラフィノース等の三糖類、スタキオース等の四糖類などが挙げられる。これらのうち三糖類が好ましい。上記水溶性の単糖類、二糖類およびオリゴ糖の誘導体としては、例えばグルコサミン、ガラクトサミン、グルクロン酸、ガラクトロン酸などが挙げられる。

【0027】上記水溶液のアミノ酸としては、例えばグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、セリン、トレオニン、プロリン、ヒドロキシプロリン、システイン、メチオニン等の中性アミノ酸、アイパラギン酸、グルタミン酸等の酸性アミノ酸、リジン、アルギニン、ヒスチジン等の塩基性アミノ酸等が挙げられる。またこれらの水溶性アミノ酸の酸(例、塩酸、硫酸、リン酸等)またはアルカリ(例、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属等)との塩を用いてもよい。水溶性のペプチド、タンパク質あるいはそれらの誘導体としては、例えばカゼイン、グロブリン、プロラミン、アルブミン、ゼラチンなどが挙げられる。上記浸透圧調節剤のうち水溶性の多価アルコール類、ならびに水溶性の単糖類、二糖類およびオリゴ糖あるいはそれらの誘導体が好ましい。水溶性の多価アルコール類、水溶性の単糖類が更に好ましい。特に好ましくは水溶性の多価アルコール類である。これら浸透圧調節剤は、単独で使用しても、1種以上を混合して使用してもよい。これらの浸透圧調節剤は、外水相の浸透圧が生理食塩水の浸透圧の約1/50ないし約5倍、好ましくは約1/25ないし約3倍となる濃度で用いられる。具体的には、これらの浸透圧調節剤の外水相中での濃度は、浸透圧調節剤が非イオン性物質の場合、約0.001ないし約60%(W/W)、好ましくは約0.01ないし約40%(W/W)、より好ましくは約0.05ないし約30%(W/W)、特に好ましくは約1%ないし約10%(W/W)であ

る。また、浸透圧調節剤がイオン性物質の場合、上記の濃度を全体のイオン価で除した濃度が用いられる。浸透圧調節剤の添加濃度は、溶解度以下である必要はなく、一部が分散状態であってもよい。

【0028】本発明の製造法において、W/O/W型乳化物を形成させる際にW/O型乳化物の粘度を約150 c pないし約10,000 c pに調整することが好ましい。粘度を調整する方法としては、例えば(1)油相の生体内分解性ポリマーの濃度を調整する、(2)水相と油相との量比を調整する、(3)W/O型乳化物の温度を調整する、(4)外水相の温度を調整する、(5)W/O型乳化物を外水相に注入する際に、例えばラインヒーター、クーラーなどでW/O型乳化物の温度を調整するなどの方法が挙げられ、これらの方法は単独でも、組み合わせ使用してもよい。上記方法においては、要は、W/O型乳化物がW/O/W型乳化物になる時のW/O型乳化物の粘度が約150 c pないし約10,000 c pになるようにしさえすればよい。上記(1)において、油相の生体内分解性ポリマーの濃度を調整する場合の濃度は、生体内分解性ポリマーの種類、有機溶媒の種類等で変化するもので一義的に決定されるものではないが、好ましくは約10ないし約80% (W/W)である。上記(2)において、水相と油相との量比を調整する場合の量比は、薬物の種類および量、油相の性質によって一義的に決定されるものではないが、好ましくはW/O=約1%ないし約50% (V/V)である。上記(3)において、W/O型乳化物の温度を調整する場合の温度は、例えば約-20℃ないし有機溶媒の沸点の範囲、好ましくは約0℃ないし約30℃、更に好ましくは約10℃ないし約20℃である。W/O型乳化物の粘度の調整の時期は、上記(1)および(2)の場合は、W/O型乳化物を製造する時点で行うことができる。また、上記(4)において、例えば外水相にW/O型乳化物を添加する際に外水相の温度をあらかじめ調整しておくことにより、上記(3)と同様の結果となるようにすればよい。外水相の温度は、例えば約5℃ないし約30℃、好ましくは約10℃ないし約25℃、更に好ましくは約12℃ないし約20℃である。

【0029】有機溶媒を除去する方法は、自体公知の方法に従って行うことができる。例えばプロペラ型攪拌機あるいはマグネチックスターラーなどで攪拌しながら常圧もしくは徐々に減圧にして有機溶媒を蒸発させる方法、ロータリーエバポレーターなどを用いて真空度を調節しながら有機溶媒を蒸発させる方法などが挙げられる。

【0030】このようにして得られた徐放性製剤、例えばマイクロカプセル(マイクロスフィアと称されることもある)は遠心分離あるいは濾過して分取した後、マイクロカプセルの表面に付着している遊離の薬物、薬物保持物質、乳化剤などを蒸留水で数回繰り返し洗浄し、蒸

留水などに再分散して凍結乾燥する。凍結乾燥の際に、凝集防止剤を加えてもよい。該凝集防止剤としては、例えばマンニトール、澱粉類(例、コーンスターチなど)などの水溶性多糖、無機塩類、アミノ酸、タンパク質などが挙げられる。これらのうち好ましくはマンニトールである。マイクロカプセルと凝集防止剤との混合比(重量比)は、約50:1ないし約1:1、好ましくは約20:1ないし約1:1、更に好ましくは約10:1ないし約5:1である。洗浄中の粒子同士の凝集を防ぐために、洗浄液である蒸留水に凝集防止剤を加えてもよい。該凝集防止剤としては、例えばマンニトール、ラクトース、ブドウ糖、デンプン類(例、コーンスターチ等)などの水溶性多糖、グリシン、フィブリン、コラーゲン等のタンパク質、塩化ナトリウム、リン酸水素ナトリウム等の無機塩類などが挙げられる。凝集防止剤は、好ましくはマンニトールである。

【0031】また、凍結乾燥の後、所望により、減圧下加温してマイクロカプセル中の水分および有機溶媒の除去をさらに行ってもよい。加熱温度が基剤として用いた生体内分解性ポリマーのガラス転移温度未満では、生理活性ペプチドの過剰量の初期放出性改善の効果がなく、また高温過ぎるとマイクロカプセルの融着、変形、生理活性物質の分解、劣化等の危険性が増大する。加熱温度は一概にいえないが、基剤として用いた生体内分解性ポリマーの物性(例、分子量、安定性等)、生理活性ペプチド、マイクロカプセルの平均粒子径、加熱時間、マイクロカプセルの乾燥程度、加熱方法等を考慮し適宜決定することができる。好ましくは、基剤として用いた生体内分解性ポリマーのガラス転移温度以上で、該マイクロカプセルの各粒子が互いに付着しない程度の温度で加熱乾燥する。より好ましくは、基剤として用いた生体内分解性ポリマーのガラス転移温度からガラス転移温度より約30℃高い温度範囲内で加熱乾燥する。ここにおいて、ガラス転移温度とは、示差走査熱量計を用い、加温速度毎分10または20℃で昇温した際に得られる中間点ガラス転移温度をいう。加熱乾燥時間も加熱温度、処理するマイクロカプセル量などによって異なるが、一般的にはマイクロカプセル自体の温度が所定の温度に達した後、約24ないし約120時間が好ましい。さらに約48ないし約120時間が好ましい。加熱方法は特に限定されないが、マイクロカプセルが均一に加熱される方法であればいかなる方法を用いてもよい。該加熱乾燥方法の好ましい具体例として、例えば恒温槽、流動槽、移動層あるいはキルン中で加熱乾燥する方法、マイクロ波で加熱乾燥する方法などが用いられる。これらの中で、恒温槽中で加熱乾燥する方法が好ましい。上記のように、凍結乾燥の後、マイクロカプセルを減圧下加温することにより、マイクロカプセル中の有機溶媒が効率よく除去され、生体に安全なマイクロカプセルを得ることができる。このようにして得られたマイクロカプセル中の

有機溶媒残存量は、約100ppm以下である。

【0032】マイクロカプセルは、そのままあるいはマイクロカプセルを原料物質として種々の剤形に製剤化し、非経口剤（例、筋肉内、皮下、臓器などへの注射剤または埋め込み剤、鼻腔、直腸、子宮などへの経粘膜剤等）、経口剤（例、カプセル剤（例、硬カプセル剤、軟カプセル剤等）、顆粒剤、散剤等の固形製剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等の液剤等）などとして投与することができる。例えば、マイクロカプセルを注射剤とするには、マイクロカプセルを分散剤（例、Tween 80, HCO-60, カルボキシメチルセルロース（カルボキシメチルセルロースナトリウムを含む）、アルギン酸ナトリウムなど）、保存剤（例、メチルパラベン、プロピルパラベンなど）、等張化剤（例、塩化ナトリウム、マンニトール、ソルビトール、ブドウ糖など）などと共に水性懸濁剤とするか、ゴマ油、コーン油などの植物油と共に分散して、油性懸濁剤として実際に使用できる徐放性注射剤とする。マイクロカプセルの粒子径は、例えば懸濁注射剤として使用する場合にはその分散度、通針性を満足する範囲であればよく、例えば、平均粒子径として約0.1から約500 μ mの範囲が挙げられる。好ましくは、約1から約300 μ mの範囲の粒子径である。さらに好ましくは、約2から約200 μ mの範囲の平均粒子径である。徐放性製剤がマイクロカプセルである場合、前記のように浸透圧調節剤を外水相中に加えることにより、その形状は通針性により適した球状になる。マイクロカプセルを無菌製剤にするには、例えば製造全工程を無菌にする方法、ガンマ線で滅菌する方法、防腐剤を添加する方法等が挙げられるが、特に限定されない。

【0033】本発明の徐放性製剤は、低毒性で哺乳動物（例、ヒト、牛、豚、犬、ネコ、マウス、ラット、ウサギ等）に対して安全に用いることができる。徐放性製剤の投与量は、薬物の種類と含量、剤形、薬物放出の持続時間、対象疾病（例、前立腺癌、前立腺肥大症、子宮内膜症、子宮筋腫、子宮線維腫、思春期早発症、乳癌、膀胱癌、子宮頸部癌、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、大腸癌、胃炎、ホジキン病、悪性黒色腫、転移、多発性骨髄腫、非ホジキン性リンパ腫、非小細胞肺癌、卵巣癌、消化性潰瘍、全身性真菌感染症、小細胞肺癌、心弁膜症、乳腺症、多嚢胞性卵巣、不妊、慢性無排卵症 40 婦人における適性排卵誘発、ざそう（アクネ）、無月経（例、続発性無月経）、卵巣および乳房の嚢胞性疾患（多嚢胞性卵巣を含む）、婦人科系の癌、卵巣性高アンドロゲン血症および多毛症、胸腺幼若化を介したT細胞産生によるAIDS、男性性犯罪者の治療のための男性避妊等のホルモン依存性疾患の治療および避妊、月経前症候群（PMS）の症状軽減、体外受精（IVF）等）、対象動物などによって種々異なるが、薬物の有効量であればよい。薬物の1回あたりの投与量としては、例えば徐放性製剤が1カ月製剤である場合、好ましく

は、成人1人当たり約0.01mgないし約100mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。さらに好ましくは、約0.05mgないし約50mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。特に好ましくは、約0.1mgないし約10mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。1回あたりの徐放性製剤の投与量は成人1人当たり好ましくは、約0.1mgないし約500mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。さらに好ましくは、約0.2mgないし約300mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。投与回数は、数週間に1回、1か月に1回、あるいは数か月に1回等、薬物の種類と含量、剤形、薬物放出の持続時間、対象疾病、対象動物などによって適宜選ぶことができる。

【0034】

【発明の実施の形態】以下に参考例および実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。以下の参考例および実施例中、%は特記しない限り重量%を示す。

【実施例】

実施例1

20 N-(S)-2-Tetrahydrofuroyl-Gly-D2NaI-D4C1Phe-D3Pal-Ser-NMeTyr-DLys(NiC)-Leu-Lys(NiSp)-Pro-DAlaNH₂（以下ペプチドAと略記する）の酢酸塩（TAP社製）500mgを、蒸留水0.6mlに溶解した。得られる溶液を、乳酸-グリコール酸共重合体（以下、PLGAと略記する）（和光純薬製、lot.940810、乳酸/グリコール酸（モル比）：74/26、GPC重量平均分子量：10,000、GPC数平均分子量：3,900、末端基定量法による数平均分子量：3,700）4.5gをジクロロメタン5.8mlに溶解した溶液に加え、小型ホモジナイザー（キネマチカ社製）で60秒間混合してW/O型乳化物を得た。このW/O型乳化物を16℃に冷却した後、予め16℃に冷却しておいた0.1%ポリビニルアルコール（EG-40、日本合成化学製）水溶液1000ml中に注入し、タービン型ホモミキサー（特殊機化製）を用い、7000rpmでW/O/W型乳化物とした。このW/O/W型乳化物を室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させ、W/O型乳化物を固化させた後、遠心分離機（O5PR-22、日立製作所）を用いて2000rpmで遠心分離した。得られる沈殿物を蒸留水に再分散後、分散液をさらに遠心分離し、遊離薬物を洗浄除去した。得られたマイクロカプセルを少量の蒸留水に再分散後、分散液にD-マンニトール0.3gを加え、凍結乾燥し、粉末としてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布、マイクロカプセル中のペプチドAの含有率はそれぞれ5ないし60 μ m、9.5%（w/w）であった。

【0035】実施例2

PLGA（和光純薬製、lot.940813、乳酸/グリコール酸（モル比）：73/27、GPC重量平均分子量：13,000、GPC数平均分子量：4,500、末端基定量法による数平均分子量：4,700）を用いる以外は実施例1と同様に

してマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布は5ないし60 μm 、マイクロカプセル中のペプチドAの含有率は9.5% (w/w) であった。

【0036】実施例3

PLGA (和光純薬製、lot.940808、乳酸/グリコール酸 (モル比) : 74/26、GPC重量平均分子量 : 7,800、GPC数平均分子量 : 3,500、末端基定量法による数平均分子量 : 3,000) を用いる以外は実施例1と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布は5ないし60 μm 、マイクロカプセル中のペプチドAの含有率は9.5% (w/w) であった。

【0037】実施例4

ペプチドAの酢酸塩の量を794mgとする以外は実施例1と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布は5ないし60 μm 、マイクロカプセル中のペプチドAの含有率は14.3% (w/w) であった。

【0038】実施例5

ペプチドAの酢酸塩15gを、蒸留水 18ml に溶解した。得られる溶液を、PLGA (和光純薬製、lot.940810、乳酸/グリコール酸 (モル比) : 74/26、GPC重量平均分子量 : 10,000、GPC数平均分子量 : 3,900、末端基定量法による数平均分子量 : 3,700) 135gをジクロロメタン174mlに溶解した溶液に加え、ホモジナイザーで混合してW/O型乳化物を得た。このW/O型乳化物を、予め17℃に冷却しておいた0.1%ポリビニルアルコール (EG-40、日本合成化学製) 水溶液30 l中に注入し、インライン型ホモミキサーを用い、W/O/W型乳化物とした。このW/O/W型乳化物を室温で攪拌してジクロロメタンを揮散させ、W/O型乳化物を固化させた後、遠心分離機を用いて遠心分離した。得られる沈殿物を蒸留水で洗浄し、遊離薬物を除去した。得られたマイクロカプセルを少量の蒸留水に再分散後、分散液にD-マンニトール13.5gを加え、凍結乾燥し、さらに恒温槽中40ないし43℃、19時間、引き続いて42ないし44℃、48時間減圧乾燥し、粉末としてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布は3ないし60 μm 、マイクロカプセル中のペプチドAの含有率は8.7% (w/w) であった。

【0039】実施例6

ペプチドAの酢酸塩の代わりに NAcD2NaI-D4C1Phe-D3Pal-Ser-Tyr-DhArg(Et2)-Leu-hArg(Et2)-Pro-DAlaNH2の酢酸塩 (シンテックス (SynTex) 社製) を用いる以外は実施例1と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布は5ないし60 μm 、マイクロカプセル中のペプチドAの含有率は9.4% (w/w) であった。

【0040】実施例7

ペプチドAの酢酸塩857mgを、蒸留水 0.8ml に溶解した。得られる溶液を、PLGA (和光純薬製、lot.950526、乳酸/グリコール酸 (モル比) : 74/26、GPC重

量平均分子量 : 11,700、GPC数平均分子量 : 5,200、末端基定量法による数平均分子量 : 3,800) 4.5gをジクロロメタン6mlに溶解した溶液に加え、ホモジナイザーで混合してW/O型乳化物を得た。この後の操作は、分散液にD-マンニトール0.5gを加える以外は、実施例1と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布は5ないし60 μm 、マイクロカプセル中のペプチドAの含有率は11.7% (w/w) であった。

【0041】実施例8

10 ペプチドAの酢酸塩の量を1125mg、蒸留水の量を1ml、ジクロロメタンの量を6.3mlとする以外は、実施例7と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布は5ないし60 μm 、マイクロカプセル中のペプチドAの含有率は14.6% (w/w) であった。

【0042】実施例9

20 ペプチドAの酢酸塩の量を1421mg、蒸留水の量を1.2ml、ジクロロメタンの量を6.7mlとする以外は、実施例7と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布は5ないし60 μm 、マイクロカプセル中のペプチドAの含有率は17.5% (w/w) であった。

【0043】実施例10

0.1% ポリビニルアルコール水溶液1,000ml中に、D-マンニトール50gを加える以外は、実施例8と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布は5ないし60 μm 、マイクロカプセル中のペプチドAの含有率は14.7% (w/w) であった。

【0044】実施例11

30 0.1% ポリビニルアルコール水溶液1,000ml中に、D-マンニトール50gを加える以外は、実施例9と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布は5ないし60 μm 、マイクロカプセル中のペプチドAの含有率は17.0% (w/w) であった。

【0045】参考例1

50 ペプチドAの酢酸塩1125mgと、PLGA (和光純薬製、lot.950526、乳酸/グリコール酸 (モル比) : 74/26、GPC重量平均分子量 : 11,700、GPC数平均分子量 : 5,200、末端基定量法による数平均分子量 : 3,800) 4.5gをジクロロメタン6.0mlに溶解した。この溶液を16℃に冷却した後、予め16℃に冷却しておいた0.1%ポリビニルアルコール (EG-40、日本合成化学製) 水溶液1000ml中に注入し、タービン型ホモミキサー (特殊機化製) を用い、7000 rpm でO/W型乳化物とした。このO/W型乳化物を室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させた後、遠心分離機 (O5PR-22、日立製作所) を用いて 2000 rpm で遠心分離した。得られる沈殿物を蒸留水に再分散後、分散液をさらに遠心分離し、遊離薬物を洗浄除去した。得られたマイクロカプセルを少量の蒸留水に再分散後、分散液にD-マンニトール0.5gを加え、凍結乾燥し、粉末としてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布は5ないし60 μm 、マ

マイクロカプセル中のペプチド A の含有率は 13.2% (w/w) であった。

【0046】参考例 2

ペプチド A の酢酸塩の量を 1421mg、ジクロロメタンの量を 6.2ml とする以外は、参考例 1 と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布は 5 ないし 60 μm 、マイクロカプセル中のペプチド A の含有率は 15.9% (w/w) であった。

【0047】参考例 3

0.1% ポリビニルアルコール水溶液 1,000ml 中に、D-マンニトール 50g を加える以外は、参考例 2 と同様にしてマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの粒度分布は 5 ないし 60 μm 、マイクロカプセル中のペプチド A の含有率は 15.5% (w/w) であった。

【0048】実験例 1

実施例 4 で得られたマイクロカプセル約 20 mg を分散溶媒 (2.5 mg のカルボキシメチルセルロース、0.5 mg のポリソルベート 80、25 mg のマンニトールを溶解した蒸留水) 0.5 ml に分散して 10 週齢雄性 SD ラットの背部皮下に 22 G 注射針で投与した。投与後一定時間 20 毎にラットを屠殺して投与部位に残存するマイクロカプセルを取り出し、この取り出したマイクロカプセル中のペプチド A を定量した結果を表 1 に示す。

【表 1】

時間 ペプチド A 残存率 (%)

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

C 07 K 7/06

識別記号

Z N A

庁内整理番号

F I

A 6 1 K 37/43

技術表示箇所

A C V

1 日	9 6 . 4
1 週	8 4 . 8
2 週	5 9 . 2
3 週	3 8 . 8
4 週	2 4 . 6

表 1 の結果に示されるように、本発明製造法により得られるマイクロカプセルでは、初期バーストがほとんどなく、ペプチド A が定常的に放出されている。

【0049】

【発明の効果】本発明の製造法によれば、ペプチド [1] またはその塩を含有する徐放性製剤が容易かつ好収率で得られる。また、本製造法により得られる徐放性製剤は、ペプチド [1] の長期間にわたる定常的な放出を示し、投与直後における過剰量の薬物放出を抑制し得る。特に、徐放性製剤投与後のペプチド [1] によるヒスタミン遊離作用が抑制される。さらに、本発明の製造法により得られる徐放性製剤は、光、熱、湿気、着色等に対して安定であり、保存安定性に優れる。特に、同一の放出パターンを有する徐放性製剤の製造においては、本発明の W/O/W 法では、従来の O/W 法と比較して、分子量がより大きくガラス転移温度のより高い生体内分解性ポリマーを使用することができるので、保存安定性のより優れた徐放性製剤を製造することができる。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.